

## 한국산 작약에서 분리한 바이로이드 유사 RNA 분자의 확인 및 유전자 분석

정동수 · 김무인 · 이재열\*  
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Detection and Genomic Analysis of Viroid-like RNA Molecules Isolated from Korean Peonies

Dong Soo Jung, Moo In Kim and Jai Youl Lee\*  
Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**ABSTRACT:** Low molecular weight (LMW) RNAs were isolated from Korean peonies which expressed symptoms of stunt and epinasty. The LMW plant RNAs were purified by Qiagen column chromatography which could separate viroid specific nucleic acid at differential salt concentration. After the inoculation of the purified RNAs from the peonies, the inoculated tomatoes (cv. Rutgers) expressed the symptoms of stunt and epinasty. Also the same molecular weight RNAs with viroid-like RNAs were isolated from the inoculated tomatoes. Double-stranded cDNA were synthesized by the methods of reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) with the purified RNA and primers. The same cDNAs associated with viroid-like RNAs were cloned from the inoculated tomatoes. The cDNA has been sequenced and its 375-nucleotides were arranged into secondary structure. The cloned cDNA showed 47-54% homology compared with other viroids. The sequence homology of the cloned cDNA were partially high with plant genomic RNAs.

**Key words:** peony, RT-PCR, sequence analysis, viroid-like RNA molecules.

바이로이드는 일반 식물 바이러스와는 달리 외피 단백질 백질을 가지고 있지 않으며, 257-376개의 염기를 가지는 저분자량의 외가닥 RNA이다(4, 13). 바이로이드는 1979년 Diener에 의해 처음 보고된 이후 지금까지 세계 전역에서 20여종이 밝혀졌으며, virusoid나 satellite RNA 분자와는 크기나 구조가 서로 조금씩 차이가 있다. 최근에 이르러 바이로이드 분자의 다양한 돌연변이체들이 발견되었고, 바이로이드 분자에서 Ribozyme의 기능이 밝혀지면서 생명공학 분야에서의 이용 가능성이 높아지고 있다(1~3, 15). 가장 작은 병원성 핵산으로 알려진 바이로이드는 80% 이상이 염기 결합함으로써 마치 막대 모양의 2차 구조를 가진다(12). 즉 외가닥의 RNA 분자의 많은 부분이 서로 염기 쌍을 이루고, 일부는 loop를 이루거나 벌어져 있다. 식물체 안에서는 선상형과 환상형의 두 가지 형태로 존재하는데, 이들 모두가 감염력을 가진다(4, 5). 다년생

식물인 작약의 뿌리는 한약재로 이용되며, 최근에 드링크 제품이 개발되면서 사용량이 급속히 증가하고 있다. 작약은 종자를 통해서 증식되지만(11), 대부분 뿌리나누기에 의한 영양번식법으로 증식되고 있다. 따라서 오랫동안 영양번식법으로 증식되어 온 작약에서는 바이로이드의 존재 가능성이 매우 높은 편이라 하겠다. 이 실험에서는 작약에서 분리한 바이로이드 유사 RNA 분자를 확인하고 이에 대한 cDNA를 제작하여 유전자분석을 시도하였다.

### 재료 및 방법

의성과 영천을 중심으로 경북 지방에서 재배되고 있는 작약(*Paonia lactiflora* var. *hortensis* MAK) 가운데 잘록 증상과 순말림 증상을 나타내는 개체를 채집하여 이른 봄부터 초여름까지 신선한 잎을 채취하여 시료로 이용하였으며 병징을 나타내는 작약의 줄기 및 뿌리도 시료로 사용하였다. 바이로이드를 포함한

\*Corresponding author.

저분자량의 RNA를 분리하기 위해서 Qiagen column chromatography를 이용하였다. 시료를 액체질소에 넣어 잘게 부수고 2×STE buffer, 0.4% Bentonite, 25% SDS를 첨가하고, 같은 양의 phenol/chloroform 용매를 처리하여 저속으로 원심분리할 후에 상등액을 얻었다. 상등액에 두 배의 차가운 ethanol을 첨가하여 냉동고에서 2시간 이상 보관한 후에 8,000 g에서 원심분리하여 침전물을 얻었다. Qiagen chromatography를 위해 얻어진 핵산 침전물을 QVI 용액(300 mM NaCl, 50 mM MOPS, 2 M urea, pH 7.0)에 녹이고 같은 용액으로 균질화된 column에 넣고 QVII 용액(600 mM NaCl, 50 mM MOPS, 2 M urea, 15% ethanol, pH 7.5)으로 비특이적으로 결합한 불순물들을 제거한 다음, QVIII 용액(1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% ethanol, pH 7.5)으로 칼럼에 잡혀있는 저분자량의 RNA를 해리시켜 분획하였다. 이렇게 얻어진 핵산 시료는 역전사와 중합효소연쇄반응(RT-PCR)과 계속되는 실험의 시료로 이용하였다(7, 10, 14).

Qiagen 칼럼으로 정제한 핵산을 시료로 이용하여 먼저 첫번째 외가닥의 cDNA를 합성하였다. 이 반응은 역전사효소(MMLV), 5×reaction buffer, 2.5 nm dNTP, 첫번째 primer(Table 1)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 phenol/chloroform을 처리하여 정제하였다. 합성된 첫번째 가닥의 cDNA를 시료로 삼아 겹가닥을 증폭하기 위하여 두번째 primer(Table 1)를 첨가하여 95°C에서 1분간 변성시키고, 62°C에서 1분 30초 동안 결합시키며, 72°C에서 2분 동안 합성시키는 과정을 30회 반복하도록 반응시켰다(10, 12).

클로닝벡터로 사용한 pT3T718U phagemid와 증폭된 단편을 *Sma*I 제한효소로 절단하고 T4 DNA ligase를 처리한 후에 *E. coli*에 형질전환하여 흰색의 colony를 선별하였다. 선별된 클론으로부터 plasmid를 분리하고 제한효소로 절단한 후에 전기영동으로 375 염기 크기의 DNA 단편이 들어있는 것을 확인하였다. 유전자 분석은 sequenase(USB, ver 2.0)로 plasmid를 시료로 Sanger 방법에 따라 양방향으로 읽었다.

**Table 1.** Synthetic primer sequences for reverse transcription and polymerase chain reaction

Primer name	Sequence	Restriction site	Direction
pHS3	5'-GCCCCGGGGCTC-CTTTCTCAG-3'	<i>Sma</i> I	Forward
pHS4	5'-GCCCCGGGGCAA-CTCTTCTCA-	<i>Sma</i> I	Reverse

바이로이드 유사 RNA의 병원성과 증식기주로서 이용가능성을 확인하기 위해서 작약으로부터 분리한 저분자량의 RNA와 plasmid로부터 분리한 DNA 단편을 토마토(cv. Rutgers)에 *carborundum*을 사용하여 접종하였다. 시간이 지나면서 나타나는 병징의 변화 과정을 조사하고 본격적인 병징발현이 시작될 때에 일정량을 시료를 취하여 Qiagen column으로 저분자량의 RNA를 분리하였다. 이것을 시료로 사용하여 RT-PCR로 cDNA를 합성하고 염기서열을 확인하였다(8, 10, 12).

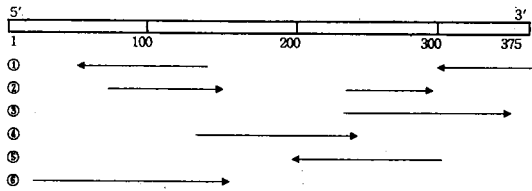
## 결 과

잘록(stunt) 증상과 부분적인 순말림(epinasty) 증상을 보이는 작약으로부터 바이로이드와 유사한 성질을 나타내는 RNA 분자를 Qiagen column을 이용하여 분리, 정제하였다(6). 분리된 RNA 분자를 시료로 역전사 효소를 이용하여 한가닥의 cDNA를 합성하고 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법으로 겹가닥의 cDNA를 증폭하였고, 이 단편이 삽입된 클론을 선별하였다(8).

삽입된 cDNA 단편을 재분리하여 6% PAGE에서 확인하였고 이들의 염기서열을 분석한 결과 375개의 염기를 가진 RNA 분자이었다. 이들 분자들의 염기서열은 이미 밝혀진 바이로이드 분자들의 염기서열과 비교해 보면 바이로이드 종류에 따라 다르지만 대체로 50% 정도의 동질성을 나타내었다. 감자 갈죽 바이로이드(PSTVd)와 호프 왜화 바이로이드(HSVd)와의 유사성은 53.0% 및 50.4-54.7%이었으며, 사과 바이로이드(ASSVd)와 아보카도 바이로이드(ASBVd)와의 비교에서는 30.2%와 44.7%로 낮은 동질성을 나타내었다(Table 2). 그리고 이들 유전자의 구조에서는 매우

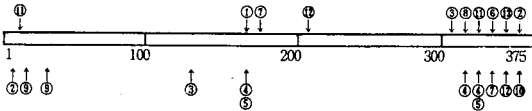
**Table 2.** Sequence homology of the viroid-like RNA comparing with other known viroids. Homology ranges from 54.7% to 30.2% with HSVd-K and ASSVd, respectively

No.	Viroid	Match(%)
1	PSTVd	53.0
2	HSVd	52.6
3	HSVd-K	54.7
4	CPFVd	50.4
5	GYSVd	51.6
6	CCCVD	40.5
7	CSVd	50.4
8	ASSVd	30.2
9	ASBVd	44.7



No.	Gene	Homology(%)	No. of nucleotide
1	Rice complete chloroplast genome	88	61-142, 303-362
2	Tabacco chloroplast Ile-and Ala-tRNA	84.6	70-162, 220-340
3	Alnus incana chloroplast tRNA	94	143-266
4	C. reflexa chloroplast trnA, trnI	90.5	130-247
5	Rice mRNA	90.1	200-195
6	Tabacco chloroplast genome DNA	84.8	14-153

Fig. 1. Six cDNA fragments in the viroid-like RNA were highly homologous with other fragments of the known genomic DNAs from NCBI sequece libraries.



No.	Enzyme	Cutting position	No.	Enzyme	Cutting position
1	<i>AccII</i>	178	8	<i>HaeIV</i>	325
2	<i>AhaI</i>	3, 369, 370	9	<i>Hinfi</i>	20, 43
3	<i>AluI</i>	135, 312	10	<i>KpnI</i>	376
4	<i>AsuI</i>	173, 323, 333	11	<i>MboII</i>	4, 330
5	<i>AvaII</i>	173, 333	12	<i>Sau3AI</i>	205, 348
6	<i>BamHI</i>	348		<i>XmaI</i>	368
7	<i>EcoRII</i>	182, 343			

Fig. 2. Restriction site map with several enzymes and their cutting positions in the cDNA corresponding with viroid-like RNA.

독특한 점이 나타나는데, 5말단이나 3말단에서 식물 유래의 genomic RNAs들과 높은 동질성을 가지는 단편들이 포함되어 있다. 어떤 부위에서는 rRNA와 mRNA의 염기서열이 같은 위치에서 방향만 반대로 겹쳐진 형태로 나타나기도 하였다(Fig. 1).

바이로이드 유사 RNA 분자의 병원성을 실험한 결과, 작약에서 분리한 바이로이드 유사 RNA 분자를 토마토에 접종한 후 2주부터 토마토에서 잘록 증상이 나타나기 시작하였으며, 4주가 지나면서는 잎으로 발전하여 줄기의 끝부분이 전체적으로 꼬부라지는 순말림 증상을 확인하였다. 잘록 증상을 나타내는 토마토에서 저분자량의 RNA를 Qiagen column으로 분리하여 전기영동으로 확인하고 RT-PCR로 이 유전자를 증폭하여 cloning하였다(Fig. 2, 3). 클로닝된 유전자의 염기서열을 분석한 결과는 작약에서 분리한 RNA와 동일한 유전자가 들어 있음을 확인하였다.

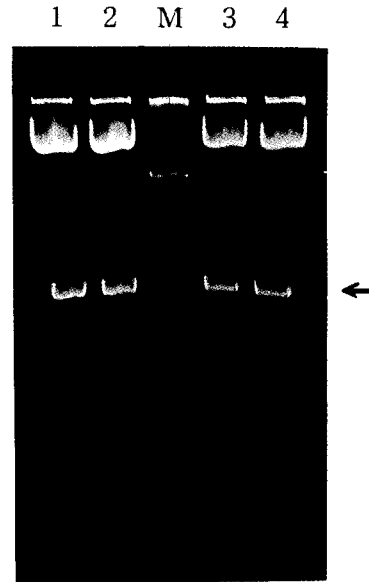


Fig. 3. Detection of the inserted cDNA fragments cloned from the peonies (1, 2) and the inoculated tomatoes (3, 4) in the 5% polyacrylamide gel. Marker(M) was pBR322 digested with *Hinfi*.

## 고 찰

바이로이드는 최근에 이르러 구조나 기능이 조금씩 밝혀지면서 분자생물학적인 연구 자료로 중요하게 이용되고 있다. 바이로이드의 종류에 따라 어떤 바이로이드는 지금까지 알려진 전형적인 바이로이드 보다도 큰 600개의 염기를 가지는 것도 있고, 2차 구조도 바이로이드의 전형적인 결합구조와 다른 특이한 형태(quasi-structure)를 취하는 것도 있으며, carnation mosaic viroid의 경우처럼 감염력만 상실한 것도 알려져 있다(13, 14, 15). 이제까지 바이로이드의 종류에 따라 독특한 사실들이 알려지고 있지만 실제로 이에 대한 직접적이고 확실한 증거들은 완전히 밝혀지지 않고 있다.

작약에서 분리한 바이로이드 유사체의 전체적인 유전자 구조는 이미 밝혀진 바이로이드 분자와는 50% 내외의 동질성을 나타내었다(7). 이러한 결과로 보아 작약의 바이로이드 유사 유전자는 이제까지 밝혀진 바이로이드 분자와는 달리 새로운 종류의 바이로이드 분자라고 생각할 수 있다. 또한 이 유전자가 보여주는 특이한 점은 식물 유래의 RNA 단편들과 높은 동질성을 가진다는 것이다(Fig. 1). 바이로이드 유사체 유전

자를 구성하는데 식물 유래의 유전자 단편들이 유전자에 조금씩 끼어들었다고 생각할 수 있다. 이와 반대로 바이로이드 유사체 유전자의 짧은 단편들이 다른 기주식물에 존재하고 있다면, 이것은 바이로이드의 유래를 확인하는 방법이 되고 또한 증식과정을 설명하는데도 커다란 도움을 줄 것이다.

현재까지 바이로이드 분자의 병징발현은 7s-rRNA와 높은 동질성을 가지고 있어 이들 분자가 기주식물의 형질발현 과정에서 antisense로 작용하여 기주식물의 대사를 억제한다고 알려져 있다(4, 14). 그리고 최근에 알려진 바로는 바이로이드가 진핵생물이 나타나기 전에 있었을 것이고, 이들이 RNA 분자의 재배열을 유도하여 지금의 intron이 유래하였다는 설명도 조심스럽게 제시되고 있다(5, 16). 바이로이드 분자들이 기주식물 안에 있는 RNA 분자들과 상관관계를 가지고 있을 것이라는 이제까지의 설명들과 비교해 볼 때에, 작약에서 분리한 바이로이드 유사체가 이제까지 알려진 바이로이드와 다른 성질도 드러나지만 기주식물체 안에서 어떠한 형태로든지 증식과 병원성을 나타내기 위해서는 서로간에 효과적인 유전정보의 전달관계가 유지되어야 한다.

바이로이드 구조는 세포성 RNA에 비해 매우 안정한 구조를 가지고 있으며, 이들은 또한 어떤 단백질도 합성할 수 없기 때문에 이들이 기주식물체 안에서 증식하기 위해서는 전사체계를 전환시켜야 한다. 이러한 전환과정을 유도하기 위해서는 바이로이드의 2차 구조가 필요한 물질의 합성을 유도하여 기주식물이 진행되는 형질발현을 억제하거나 약화시키고 다른 방향으로 진행시킬 수 있어야 한다. 따라서 바이로이드 분자의 유전자로부터 유래하는 여러 가지 변이체에 대한 연구는 이러한 의문을 해결할 수 있는 하나의 단서를 제공할 것이다.

바이로이드 RNA 분자의 경우 전사 그 자체가 복제의 개념이기 때문에 전사와 복제가 진행되는 동안에 드러날 수 있는 (+)가닥과 (-)가닥을 비롯한 단량체와 다량체를 확인하는 것도 중요하다. 바이로이드 분자의 전사와 복제과정은 바이로이드 분자의 염기서열이 바뀐 여러 종류의 변이체가 나타내는 2차 구조의 변화로부터 어느 정도의 설명을 이끌어낼 수 있을 것이다(16). 또한 염기서열의 차이로 구분되는 바이로이드의 특정 유전자가 전혀 다른 위치에 나타나는 것도 바이로이드의 유전자 변화를 설명하는 하나의 단서가 될 수 있다(9, 14, 16). 작약에서 분리한 바이로이드 유사체 유전자 안에는 식물 유래의 유전자 단편들과 매우 닮은 부분이 있다. 이러한 유전자 구성은 기주식물

체 안에서 이루어지는 바이로이드 분자의 전사와 복제과정에서 특이적이거나 비특이적으로 끼어들게 된 유전자들의 복합체일 것이라고 생각할 수 있다(3, 14, 16). 아직까지 바이로이드의 유래와 복제방법에 관해서 확실히 밝혀지지 않았으므로 이러한 문제를 해결하고자 바이로이드의 여러 가지 변이체를 확보하고 이들의 유전자를 분석하여 비교하고 있다.

작약에서 분리한 바이로이드 유사 분자의 감염력을 확인하기 위하여 건전한 토마토에 기계적인 방법으로 접종하여 이들 분자의 증식을 확인하였다. 작약에서 분리한 바이로이드 유사 RNA는 토마토에서 독자적인 증식 능력을 나타내므로 토마토는 이 저분자량의 RNA의 증식용 기주로 이용할 수 있었다. 이제까지의 결과로 보아 작약에서 분리한 바이로이드 유사체가 다른 식물들에서도 증식할 수 있다는 것을 의미하므로 경우에 따라서는 또 다른 새로운 농작물에도 피해를 일으킬 수 있을 것이다. 바이로이드가 새로운 기주식물에 감염되어 일으키는 피해를 예방하기 위해서 바이로이드 분자와 기주식물 사이에서 이루어지는 분자생물학적인 정보를 축적하여야 한다(10). 또한 바이로이드 분자에 관한 연구를 바탕으로 영양번식에 이용되는 건전한 모본을 안정적으로 생산하여 바이로이드 병의 예방과 방제에도 효과적으로 이용할 수 있을 것이다.

## 요 약

잘록 증상과 순말림 증상을 보이는 한국산 작약에서 Qiagen column chromatography를 이용해서 저분자량의 바이로이드 유사 RNA 분자는 분리, 정제하였다. 겹가닥의 cDNA는 앞 뒤 방향으로 두 개의 primer를 사용하여 RT-PCR로 합성하였다. 작약에서 분리한 바이로이드 유사체를 기계적 방법으로 접종한 토마토는 순말림 증상을 보였고, 토마토에서 분리한 바이로이드 유사체에 대한 cDNA를 같은 방법으로 제작하였다. 이 유전자의 염기서열은 375개의 염기를 가지는 외가닥 RNA이며, 기주식물의 genomic RNA와 chloroplast RNA들과 부분적으로 높은 동질성을 나타내었다. 또한 이 유전자는 이미 알려진 다른 바이로이드와는 50% 내외의 유사성을 보였다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1995년도 교육부 유전공학 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며, 이병주 채취에 도움을

준 경북대학교 정재동 교수에게 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Beaudry, D., Bussiere, F., Lareau, F., Lessard, C. and Perreault, J. P. 1995. The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleavage in vitro solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* 23 : 745-752.
2. Carmen, H. and Ricardo, F. 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleavage in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 3711-3715.
3. Daros, J. A. and Flores, R. 1995. Identification of a retroviroid-like element from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 6856-6860.
4. Diener, T. O. 1987. The viroids. Plenum Press, New York and London. 344p.
5. Diener, T. O. 1986. Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 58-62.
6. Jung, D. S., Sanger, H. L. and Lee, J. Y. 1997. Detection of viroid-like RNA molecules in Korean peonies(*Paeonia lactiflora*). *Korean J. Plant Pathol.* 13 : 1-4.
7. Koltunow, M. A. and Rezaian, M. A. 1989. A Scheme for viroid classification. *Intervirology* 30 : 194-201.
8. Lakshman, D. K., Tavantzis, S. M., Boucher, A. and Singh, R. P. 1992. A rapid and versatile method for cloning viroids or other circular plant pathogenic RNAs. *Analytical Biochemistry* 203 : 269-273.
9. Langland, J. O., Jin, S., Jacobs, B. L. and Roth, D. A. 1995. Identification of a plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 108 : 1259-1267.
10. Laurene, L. and Ahmed, H. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus viroid and MLO nucleic acids. *Journal of Virological Methods* 49 : 295-304.
11. Lee, J. Y., Lee, S. H. and Sanger, H. L. 1990. Viroid diseases occurring on Korean hop plants. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 256-260.
12. Puchta, H., and Sanger, H. L. 1988. An improved procedure for the rapid one-step-cloning of full-length viroid cDNA. *Arch. virol.* 101 : 137-140.
13. Sanger, H. L. and Lee, J. Y. 1993. Molecular biology of the viroids, the smallest pathogens presently known. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 139-148.
14. Sano, T., Hataya, T., Sasaki, A. and Shikata, E. 1986. Etrog Citron is latently infected with hop stunt viroid-like RNA. *Proc. Japan. Acad.* 62, ser. B : 325-328.
15. Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E. and Meshi, T. 1985. A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J. Gen. Virol.* 66 : 333-338.
16. Visvader, J. E. and Symons, R. H. 1986. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucl. Acids Res.* 13 : 2907-2920

(Received March 30, 1997)